

NEW SACCHARIDE, ITS PRODUCTION AND IMMUNOPOTENTIATOR

Publication number: JP8092303
Publication date: 1996-04-09
Inventor: YOSHIZAWA YASUKO; TSUNEHIRO ATSUSHI;
YAMAMOTO HIROSHI; ITO MASAO; NOMURA
KAZUYO
Applicant: SHOWA SANGYO CO; SHIN NIHON KAGAKU KOGYO
KK
Classification:
- international: C07H3/06; C07H11/00; C08B37/00; C12P19/04;
C07H3/00; C07H11/00; C08B37/00; C12P19/00; (IPC1-
7): C08B37/00; A61K31/725; C07H3/06; C07H11/00;
C12P19/04; C12P19/04; C12R1/89
- european:
Application number: JP19940251275 19940920
Priority number(s): JP19940251275 19940920

Report a data error here

Abstract of JP8092303

PURPOSE: To obtain an acidic saccharide, derived from a red algal mucilaginous polysaccharide and expected to have antitumor activities due to excellent immunopotentiating activities and the capability of inducing a tumor necrosis factor(TNF) possessed thereby. CONSTITUTION: This new acidic saccharide contains constituent monosaccharides of A and B. A is L-galactose-6-sulfate or 3,6-anhydro-L-galactose and B is D- galactose or 6-O-methyl-D-galactose. Both A and B are alternately arranged and the bonding mode of the A&rarr B is α 1&rarr +3 and the bonding mode of B&rarr A is β 1&rarr 4. The monosaccharide constituting the nonreducing terminal is the L- galactose-6-sulfate. The saccharide contains >=2 monosaccharides of L- galactose-6-sulfate as the constituent monosaccharide in one molecule. The number of the constituent monosaccharides is an even number of 4-500. This method for producing the acidic saccharide is provided and the immunopotentiator contains the acidic saccharide as an active ingredient.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-92303

(43)公開日 平成8年(1996)4月9日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 8 B 37/00		H 7433-4C		
A 6 1 K 31/725	ABD			
	ADU			
C 0 7 H 3/06				
11/00				

審査請求 未請求 請求項の数9 F D (全 14 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平6-251275	(71)出願人	000187079 昭和産業株式会社 東京都千代田区内神田2丁目2番1号
(22)出願日	平成6年(1994)9月20日	(71)出願人	000191146 新日本化学工業株式会社 愛知県安城市昭和町19番10号
		(72)発明者	吉沢 康子 千葉県船橋市日の出2-20-2 昭和産業株式会社総合研究所内
		(72)発明者	常広 淳 千葉県船橋市日の出2-20-2 昭和産業株式会社総合研究所内
		(74)代理人	弁理士 坂口 昇造
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規な糖、その製造方法および免疫賦活剤

(57)【要約】

【構成】 構成単糖がAとBであり、AはL-ガラクトース-6-硫酸もしくは3, 6-アンヒドロ-L-ガラクトースでBはD-ガラクトースもしくは6-O-メチル-D-ガラクトースであり、AとBが交互に配列しており、A→Bの結合様式が α 1→3であり、B→Aの結合様式が β 1→4であり、非還元末端を構成する単糖がL-ガラクトース-6-硫酸であり、構成単糖としてL-ガラクトース-6-硫酸を1分子中に2以上含有し、構成単糖の数が4～500の偶数である酸性糖、その製造方法およびそれを有効成分とする免疫賦活剤。

【効果】 紅藻粘質多糖に由来する該酸性糖は優れた免疫賦活活性を有し、またこの免疫賦活活性は腫瘍壊死因子(TNF)誘導能も含むので、該酸性糖は抗腫瘍活性をも有するものと期待される。

BEST AVAILABLE COPY

1

2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 構成単糖がAとBであり、AはL-ガラクトース-6-硫酸もしくは3, 6-アンヒドロ-L-ガラクトースでBはD-ガラクトースもしくは6-O-メチル-D-ガラクトースであり、AとBが交互に配列しており、A→Bの結合様式が $\alpha 1 \rightarrow 3$ であり、B→Aの結合様式が $\beta 1 \rightarrow 4$ であり、非還元末端を構成する単糖がL-ガラクトース-6-硫酸であり、構成単糖としてL-ガラクトース-6-硫酸を1分子中に2以上含有し、構成単糖の数が4～500の偶数である酸性糖。

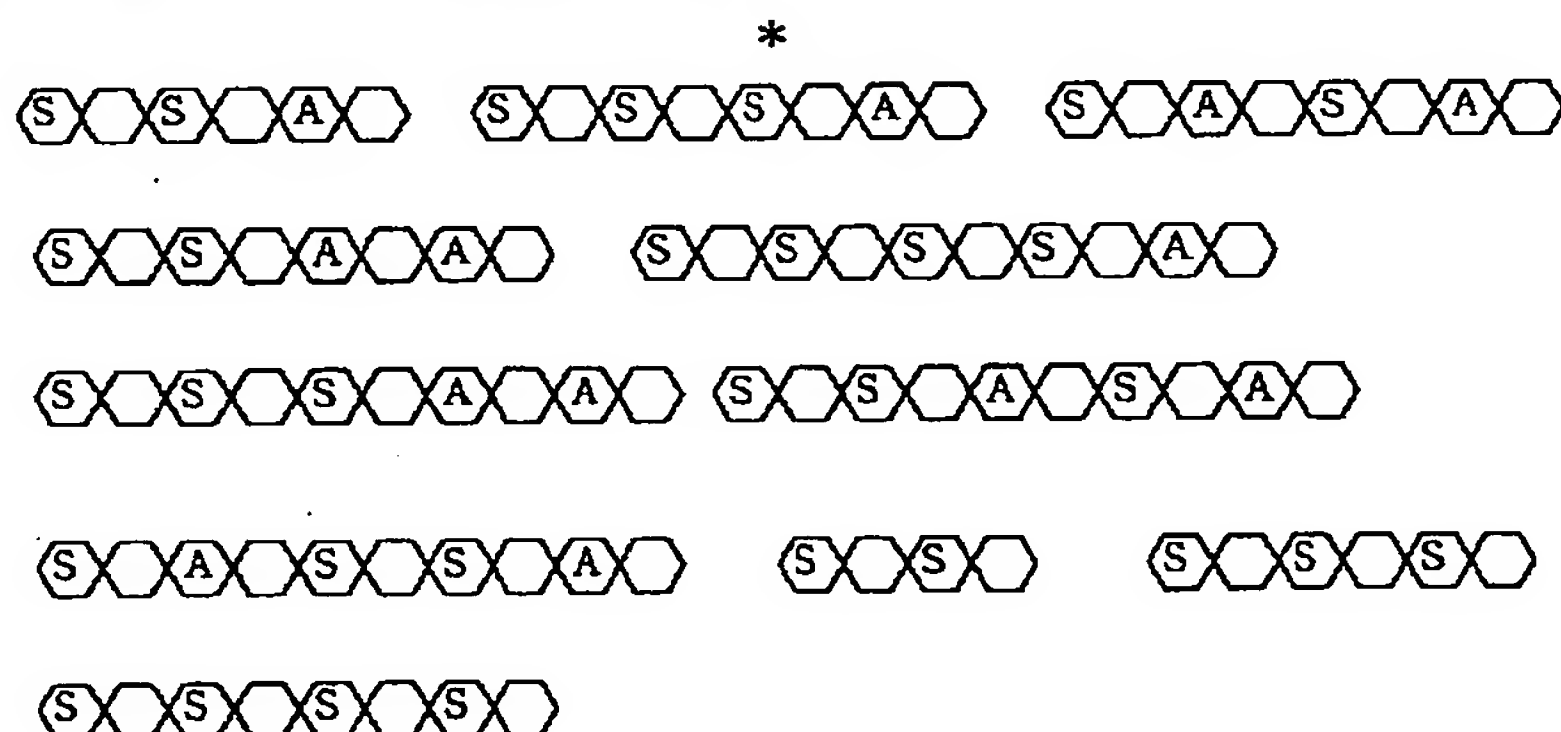
【請求項2】 構成単糖の数が4～200の偶数である請求項1記載の酸性糖。

【請求項3】 構成単糖の数が4～14の偶数である請求項1記載の酸性糖。

* 【請求項4】 各単糖単位に、非還元末端から還元末端へ向かって1、2、3、4…n-1、nと番号を付すとして、n-1の構成単糖が3, 6-アンヒドロ-L-ガラクトースであって、3、5…n-3の構成単糖がL-ガラクトース-6-硫酸または3, 6-アンヒドロ-L-ガラクトースであって、構成単糖の数が6以上の偶数であるか、またはn-1の構成単糖がL-ガラクトース-6-硫酸であって、3、5…n-3の構成単糖もL-ガラクトース-6-硫酸であって、構成単糖の数が4以上の偶数である請求項1記載の酸性糖。

【請求項5】 構成単糖の配列が以下の式で表される請求項1記載の酸性糖。

【化1】



(式中、 \square はD-ガラクトース残基または6-O-メチル-D-ガラクトース残基であり、 \square はL-ガラクトース-6-硫酸残基であり、 \square は3,6-アンヒドロ-L-ガラクトース残基である)。

【請求項6】 紅藻類に属する海藻中に含まれ、水性溶媒で抽出される粘質多糖を、下記紅藻粘質多糖分解酵素IおよびIIの少なくとも1つを含有する酵素源で加水分解するか、下記紅藻粘質多糖分解酵素IIIとIおよびIIの少なくとも1つとを含有する酵素源で加水分解して得られる低粘性酸性糖中の構成単糖の数が500より大の画分を除去し、かつ1分子中の硫酸基数がそれぞれ2以上である酸性糖混合物を分取するか、または該酸性糖混合物をさらに適宜分離することを特徴とする、請求項1記載の酸性糖の製造方法：

紅藻粘質多糖分解酵素I：3, 6-アンヒドロ-L-ガラクトース、D-ガラクトース、6-O-メチル-D-ガラクトースおよびL-ガラクトース-6-硫酸をそれぞれA-L-Gal、D-Gal、Me-D-GalおよびL-GalSで表すと、該粘質多糖中の、A-L-Gal-D-Gal残基またはA-L-Gal-Me-D-Gal残基の還元末端側の $\beta 1 \rightarrow 4$ 結合を加水分解する特異性を有する酵素

紅藻粘質多糖分解酵素II：該粘質多糖中の、A-L-Gal-D-Gal-A-L-Gal-D-Gal残基

30 A-L-Gal-D-Gal残基またはA-L-Gal-Me-D-Gal-A-L-Gal-Me-D-Gal残基の還元末端側の $\beta 1 \rightarrow 4$ 結合を加水分解する特異性を有するエンド型酵素

紅藻粘質多糖分解酵素III：該粘質多糖中の、L-GalS-D-Gal残基またはL-GalS-Me-D-Gal残基の還元末端側の $\beta 1 \rightarrow 4$ 結合を、該還元末端側にA-L-Gal-D-Gal残基またはA-L-Gal-Me-D-Gal残基が存在し、さらに該L-GalS-D-Gal残基またはA-L-GalS-Me-D-Gal残基の非還元末端側にA-L-Gal-D-Gal残基、A-L-Gal-Me-D-Gal残基、L-GalS-D-Gal残基またはL-GalS-Me-D-Gal残基が存在する場合にのみ、加水分解する特異性を有するエンド型酵素。

【請求項7】 請求項1、2、3、4または5記載の酸性糖の少なくとも1つを有効成分として含有する免疫賦活剤。

【請求項8】 紅藻類に属する海藻中に含まれ、水性溶媒で抽出される粘質多糖を、請求項6記載の紅藻粘質多

酵素IIIとIおよびIIの少なくとも1つとを含有する酵素源で加水分解して得られる低粘性酸性糖中のGPC法によって測定される分子量が100,000より大の画分を除去して得られる酸性糖混合物であって、分子中の硫酸基数がそれぞれ2以上である酸性糖混合物を有効成分として含有する免疫賦活剤。

【請求項9】 酸性糖混合物が該低粘性酸性糖の分子量が45,000より大の画分を除去して得られる酸性糖混合物であって、分子中の硫酸基数がそれぞれ2以上である酸性糖混合物である請求項8記載の免疫賦活剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は紅藻類から得ることができる新規な酸性糖、その製造方法およびそれを有効成分として含有する免疫賦活剤に関する。

【0002】

【従来の技術】 海藻類は日本では古くから食用として、また民間薬として用いられてきた。近年、その生理活性に注目した研究開発が行われるようになってきた。例えば、特開昭63-316732号公報および特開平5-271306号には紅藻類由来の抗ウィルス剤が、また特開昭64-66126号公報には紅藻類由来の抗腫瘍剤が、それぞれ開示されている。さらに、特開平3-284626号公報および特開平5-139988号公報には、いずれも紅藻類であるアマノリ属およびオゴノリ属の海藻から水性溶媒で抽出される物質を有効成分とする免疫賦活剤がそれぞれ開示されている。オゴノリ属やアマノリ属に属する海藻から抽出される物質は、主としてアガロースを基本骨格に持つ高分子の酸性多糖を主成分とするものであることが知られている。これらの酸性多糖は粘性が高く、時によっては強いゲルを形成するため、食品や飼料に混合したり、これ自体を経口、非経口投与に適するような剤形に製剤することは極めて困難である。しかも製造工程での取扱いも難しく、操作が煩雑となるなどの大きな問題点があった。

【0003】 かかる粘質酸性多糖を加水分解する酵素として、シュードモナス・アトランティカ (*Pseudomonas atlantica*)、サイトファーガ・エスピー (*Cytophaga sp.*)、ビブリオ・エスピー AP-2 (*Vibrio sp.* AP-2)等が、該粘質酸性多糖中の β -1, 4結合を加水分解する能力を有する β -アガラゼを生産することが報告されている (Biochem., 105, 317-321(1967)、Chin. J. Oceanol. Limnol., 8 (2)135-149(1990)、Eur. J. Biochem., 133, 673-684(1983)、Eur. J. Biochem., 187, 461-465(1990)等)。また、アガラゼ (β -または α -アガラゼ)を利用して寒天含有物質 (オゴノリ、テングサ等の原藻、寒天製造過程の中間産物、寒天、アガロース等) からオリゴ糖を製造する方法が特開平2-65788号公報に記載されているが、製造されるオリゴ糖については単に

るにすぎない。また、紅藻類アマノリ属に属する海藻にビブリオ属に属する微生物の産生する多糖類分解酵素を作用させてオリゴ糖を製造する方法が特開平4-271791号公報に記載されているが、製造されるオリゴ糖についてはゲル濾過分画範囲100~1800ダルトンであると記載されているにすぎない。

【0004】 原始紅藻綱のアマノリ属の海藻から得られる多糖としてポルフィラン型多糖類が知られている。アマノリ属に属するマルバチシマクロノリ (*Porphyra umbilicalis*)から得られるポルフィランは、非還元末端側で α 1 \rightarrow 3結合をしたD-ガラクトースまたは6-O-メチル-D-ガラクトースと、非還元末端で β 1 \rightarrow 4結合をした3, 6-アンヒドロ-L-ガラクトースまたはL-ガラクトース-6-硫酸が交互に結合した構造をもつ (総合多糖類科学 (下)、講談社サイエンティフィック、306頁(1973))。ポルフィランを β -アガラゼで加水分解することにより、6-O-スルファト- α -L-ガラクトピラノシル (1 \rightarrow 3)- β -D-ガラクトピラノシル (1 \rightarrow 4)-3, 6-アンヒドロ- α -L-ガラクトピラノシル (1 \rightarrow 3)-D-ガラクトピラノース (後述の表記法によると式

【0005】

【化2】



【0006】 で表される)等のオリゴ糖が得られる (Eur. J. Biochem. 133, 673-684(1983))。真正紅藻綱では細胞間隙を構成する粘質多糖類の主成分は寒天である。寒天はテングサ属、ムカデノリ属、オゴノリ属、イバラノリ属、スギノリ属などに属する紅藻から得られ、中性のアガロース、ピルビン酸を含むアガロース骨格をもつ多糖類、硫酸エステルを多く含むアガロース骨格をもつ多糖類の3種の混合物である。寒天の成分量及び特徴は、紅藻の成長段階の相違とともに、また紅藻の種類によって大きく異なる。アガロースは中性多糖で非還元末端側で α 1 \rightarrow 3結合をしたD-ガラクトースまたは6-O-メチル-D-ガラクトースと、非還元末端側で β 1 \rightarrow 4結合をした3, 6-アンヒドロ-L-ガラクトースが交互に結合した構造をもつ。硫酸エステルを含む多糖は、アガロースの3, 6-アンヒドロ-L-ガラクトース残基がガラクトース-6-硫酸残基に一部置換された構造をもつ (前出の総合多糖類科学 (下)、298-304頁)。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】 本発明者らは紅藻類に属する海藻から粘質多糖 (粘質酸性多糖) を水性溶媒で抽出し、固液分離して得られる抽出液に、 β -アガラゼを作用させて得られる低粘性酸性糖が免疫賦活剤作用を有することを見出した (特願平5-67479、平成5年3月3日出願)。一方、本発明者らはシュードモナス・

体とするオリゴ糖を生成する反応を触媒する」新規な紅藻粘質多糖分解酵素を生成することを見出した（特願平6-57469）。

【0008】本発明者らは上記菌株の培養液中に上記酵素とは異なるが、 $\beta 1 \rightarrow 4$ ガラクトシド結合を加水分解する酵素がさらに存在することを見出した。本発明者らは上記粘質多糖をこれらの酵素で加水分解することにより、免疫賦活作用が大巾に向上した低粘性酸性糖が得られ、この低粘性酸性糖を分画することにより、免疫賦活活性がさらに大巾に向上した酸性糖が得られることを見出した。本発明はこれらの知見に基づいて完成されたものであり、その目的とするところは免疫賦活活性に優れた新規物質、その製造方法およびそれを有効成分として含有する新規免疫賦活剤の提供である。

【0009】

【発明を解決するための手段】本発明は構成単糖がAとBであり、AはL-ガラクトース-6-硫酸もしくは3, 6-アンヒドロ-L-ガラクトースでBはD-ガラクトースもしくは6-O-メチル-D-ガラクトースであり、AとBが交互に配列しており、A \rightarrow Bの結合様式が $\alpha 1 \rightarrow 3$ であり、B \rightarrow Aの結合様式が $\beta 1 \rightarrow 4$ であり、非還元末端を構成する単糖がL-ガラクトース-6-硫酸であり、構成単糖としてL-ガラクトース-6-硫酸を1分子中に2以上含有し、構成単糖の数が4~500の偶数である酸性糖；紅藻類に属する海藻中に含まれ、水性溶媒で抽出される粘質多糖を、下記紅藻粘質多糖分解酵素IおよびIIの少なくとも1つを含有する酵素源で加水分解するか、下記紅藻粘質多糖分解酵素IIIとIおよびIIの少なくとも1つとを含有する酵素源で加水分解して得られる低粘性酸性糖中の構成単糖の数が500より大の画分を除去し、かつ1分子中の硫酸基数がそれぞれ2以上である酸性糖混合物を分取するか、または該酸性糖混合物をさらに適宜分離することを特徴とする、上記酸性糖の製造方法：

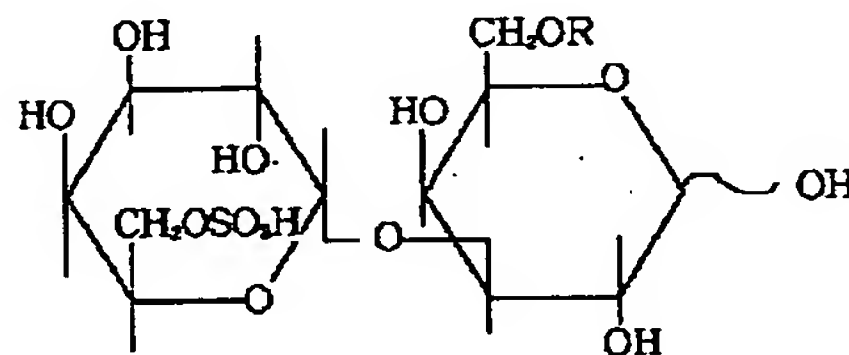
紅藻粘質多糖分解酵素I：3, 6-アンヒドロ-L-ガラクトース、D-ガラクトース、6-O-メチル-D-ガラクトースおよびL-ガラクトース-6-硫酸をそれぞれA-L-Gal、D-Gal、Me-D-GalおよびL-GalSで表すと、該粘質多糖中の、A-L-Gal-D-Gal残基またはA-L-Gal-Me-D-Gal残基の還元末端側の $\beta 1 \rightarrow 4$ 結合を加水分解する特異性を有する酵素

紅藻粘質多糖分解酵素II：該粘質多糖中の、A-L-Gal-D-Gal-A-L-Gal-D-Gal残基、A-L-Gal-D-Gal-A-L-Gal-Me-D-Gal残基、A-L-Gal-Me-D-Gal-A-L-Gal-D-Gal残基またはA-L-Gal-Me-D-Gal-A-L-Gal-Me-D-Gal残基の還元末端側の $\beta 1 \rightarrow 4$ 結合を加水分解する特異性を有する酵素

【0010】紅藻粘質多糖分解酵素III：該粘質多糖中の、L-GalS-D-Gal残基またはL-GalS-Me-D-Gal残基の還元末端側の $\beta 1 \rightarrow 4$ 結合を、該還元末端側にA-L-Gal-D-Gal残基またはA-L-Gal-Me-D-Gal残基が存在し、さらに該L-GalS-D-Gal残基またはA-L-GalS-Me-D-Gal残基の非還元末端側にA-L-Gal-D-Gal残基、A-L-Gal-Me-D-Gal残基、L-GalS-D-Gal残基またはL-GalS-Me-D-Gal残基が存在する場合にのみ、加水分解する特異性を有するエンド型酵素；上記酸性糖の少なくとも1つを有効成分として含有する免疫賦活剤（以下、免疫賦活剤1という場合がある）；および紅藻類に属する海藻中に含まれ、水性溶媒で抽出される粘質多糖を、上記紅藻粘質多糖分解酵素IおよびIIの少なくとも1つを含有する酵素源で加水分解するか、上記紅藻粘質多糖分解酵素IIIとIおよびIIの少なくとも1つとを含有する酵素源で加水分解して得られる低粘性酸性糖中のGPC法によって測定される分子量が100,000より大の画分を除去して得られる酸性糖混合物であって、分子中の硫酸基数がそれぞれ2以上である酸性糖混合物を有効成分として含有する免疫賦活剤（以下、免疫賦活剤2という場合がある）に関する。以下、上記紅藻粘質多糖分解酵素I、II、IIIを総称して単に紅藻粘質多糖分解酵素という場合がある。本発明を詳述するに先立って、本発明において用いる糖単位の表記法について説明する。本発明においては式

【0011】

【化3】



【0012】（式中、Rは水素原子またはメチル基である）で表される6-O-スルファト- α -L-ガラクトピラノシル-（1 \rightarrow 3）-D-ガラクトピラノースもしくは6-O-スルファト- α -L-ガラクトピラノシル-（1 \rightarrow 3）-6-O-メチル-D-ガラクトピラノースを

【0013】

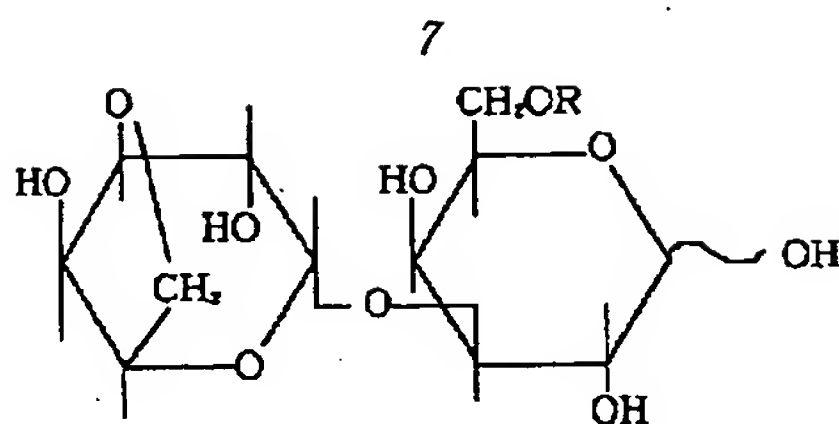
【化4】



【0014】と略記する。同様に式

【0015】

【化5】



【0016】(式中、Rは上記と同義である)で表される3, 6-アンヒドロ-α-L-ガラクトピラノシル-(1→3)-D-ガラクトピラノースもしくは3, 6-アンヒドロ-α-L-ガラクトピラノシル-(1→3)-

-6-O-メチル-D-ガラクトピラノースを

【0017】

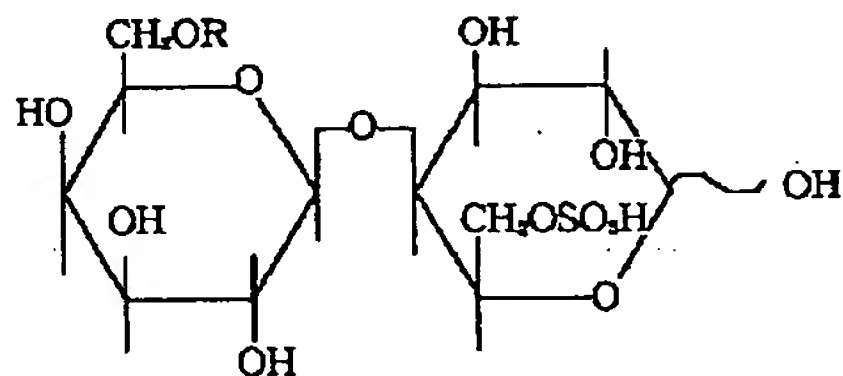
【化6】



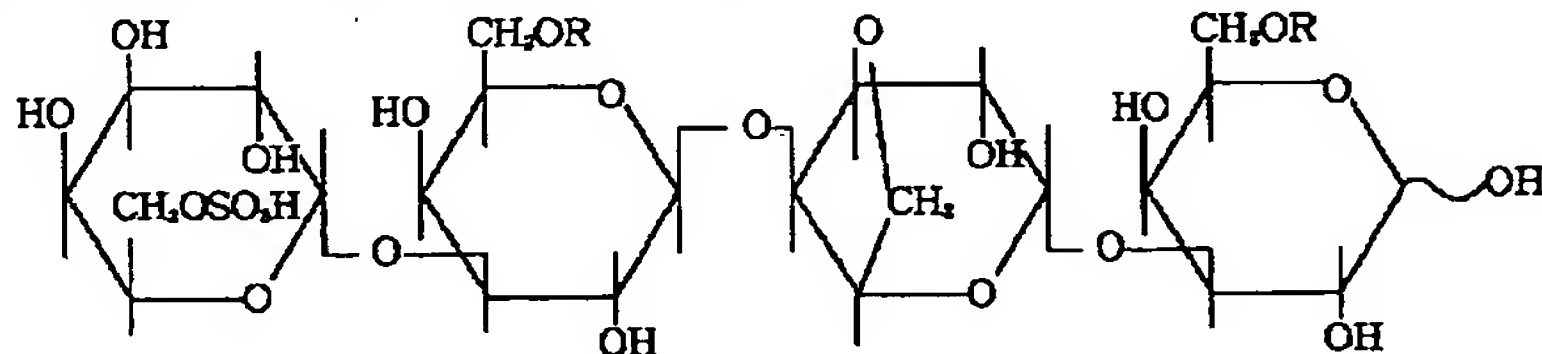
【0018】と略記する。また、式

【0019】

【化7】



【0020】(式中、Rは上記と同義である)で表されるβ-D-ガラクトピラノシル-(1→4)-6-O-スルファート-L-ガラクトピラノースもしくは6-O-*



【0028】(式中、Rは上記と同義である)で表される6-O-スルファート-α-L-ガラクトピラノシル-(1→3)-β-D-ガラクトピラノシル(1→4)-3, 6-アンヒドロ-α-L-ガラクトピラノシル-(1→3)-D-ガラクトピラノース、6-O-スルファート-α-L-ガラクトピラノシル-(1→3)-β-D-ガラクトピラノシル(1→4)-3, 6-アンヒドロ-α-L-ガラクトピラノシル-(1→3)-6-O-メチル-D-ガラクトピラノース、6-O-スルファート-α-L-ガラクトピラノシル-(1→3)-6-O-メチル-β-D-ガラクトピラノシル(1→4)-3, 6-アンヒドロ-α-L-ガラクトピラノシル-(1→3)-D-ガラクトピラノースもしくは6-O-スルファート-α-L-ガラクトピラノシル-(1→3)-6-O-メチル-β-D-ガラクトピラノシル(1→4)-3, 6-アンヒドロ-α-L-ガラクトピラノシル-

8

*メチル-β-D-ガラクトピラノシル-(1→4)-6-O-スルファート-L-ガラクトピラノースを

【0021】

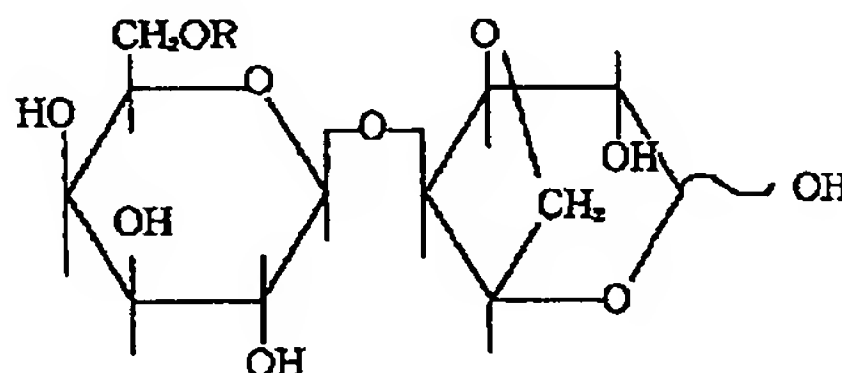
【化8】



【0022】と略記する。同様に式

【0023】

【化9】



【0024】(式中、Rは上記と同義である)で表されるβ-D-ガラクトピラノシル-(1→4)-3, 6-アンヒドロ-L-ガラクトピラノースもしくは6-O-メチル-β-D-ガラクトピラノシル-(1→4)-3, 6-アンヒドロ-L-ガラクトピラノースを

【0025】

【化10】



【0026】と略記する。この略記法に従えば式

【0027】

【化11】

【0029】

【化12】



【0030】と略記される。上記略記法から理解されるごとく、6-O-スルファート-L-ガラクトピラノースもしくは3, 6-アンヒドロ-L-ガラクトースの還元末端にD-ガラクトースもしくは6-O-メチル-D-ガラクトースのOH基が結合(グリコシド結合)する場合には常にα1→3結合し、逆にD-ガラクトースもしくは6-O-メチル-D-ガラクトースの還元末端に6-O-スルファート-L-ガラクトピラノースもしくは3, 6-アンヒドロ-L-ガラクトースのOH基が結合(グリコシド結合)する場合には常にβ1→4結合している。

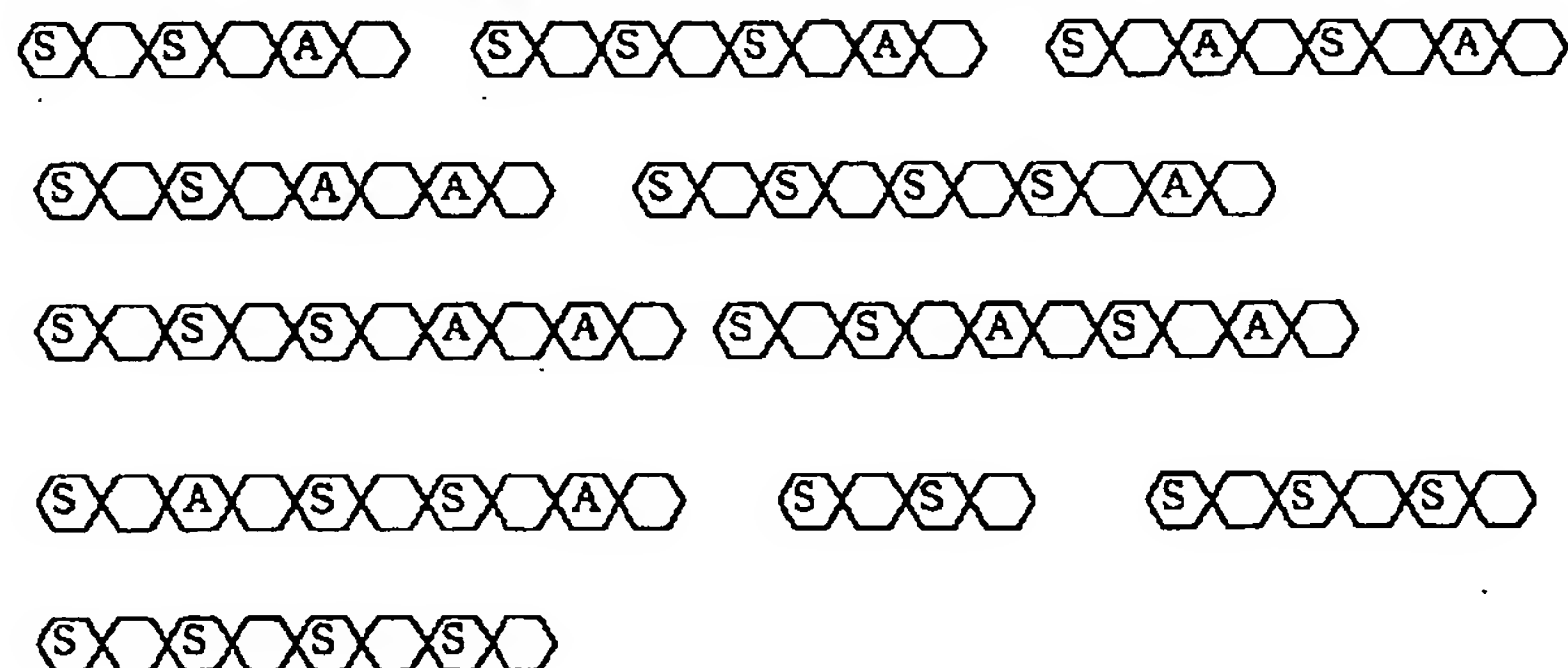
【0031】前記したごとく、本発明の酸性糖は(1)構成単位がAとRであり、AはL-ガラクトース-6-

6-アンヒドロ-L-ガラクトピラノース)でBはD-ガラクトース(=D-ガラクトピラノース)もしくは6-O-メチル-D-ガラクトース(=6-O-メチル-D-ガラクトピラノース)であり、AとBが交互に配列しており、A→Bの結合様式が α 1→3であり、B→Aの結合様式が β 1→4であり、非還元末端を構成する単糖がL-ガラクトース-6-硫酸であり、構成単糖としてL-ガラクトース-6-硫酸を1分子中に2以上含有し、構成単糖の数が4~500の偶数である酸性糖である。上記(1)の酸性糖中、好ましいものは(2)構成単糖の数が4~200の偶数である上記(1)の酸性糖であり、さらに好ましいものは(3)構成単糖の数が4~14の偶数である上記(1)の酸性糖である。また、本発明の酸性糖中好ましいものは、(4)各単糖単位に、非*

*還元末端から還元末端へ向かって1、2、3、4...n-1、nと番号を付すとして、n-1の構成単糖が3、6-アンヒドロ-L-ガラクトースであって、3、5...n-3の構成単糖がL-ガラクトース-6-硫酸または3、6-アンヒドロ-L-ガラクトースであって、構成単糖の数が6以上の偶数であるか、またはn-1の構成単糖がL-ガラクトース-6-硫酸であって、3、5...n-3の構成単位もL-ガラクトース-6-硫酸であって、構成単糖の数が4以上の偶数である上記(1)、(2)または(3)の酸性糖である。また、本発明の酸性糖中さらに好ましいものは、(5)構成単糖の配列が以下の式で表される上記(1)の酸性糖である：

【0032】

【化13】



(式中、 \square はD-ガラクトース残基または6-O-メチル-D-ガラクトース残基であり、 \textcircled{S} はL-ガラクトース-6-硫酸残基であり、 \textcircled{A} は3,6-アンヒドロ-L-ガラクトース残基である)。

【0033】次に本発明の酸性糖の製法を以下の製法1および2で分説する。

酸性糖の製法1

上記(1)~(5)の本発明の酸性糖中、n-1番目の、すなわち還元末端から2番目の構成単糖が3、6-アンヒドロ-L-ガラクトースである酸性糖は、紅藻類に属する海藻中に含まれ、水性溶媒で抽出される粘質多糖(粘質酸性多糖)を、上記で定義した紅藻粘質多糖分解酵素IもしくはIIまたはこれらの混合物またはそれらを含む物質(培養濾液等)を用いて加水分解して得られる低粘性酸性糖中の、分子量が100,000より大、好ましくは45,000より大、または3,000から100,000もしくは45,000までの任意の値より大、例えば7,500より大の画分、または構成単糖の数が500より大、好ましくは200より大、または14から500もしくは200までの任意の値より大、例えば36より大となるような分子量の画分を溶媒沈澱、塩析、限外濾過またはゲル濾過等によって除去し、得られる比較的低分子量の画分を、物質をイオン性の違いで分離する方法、例えば陰イオン交換クロマトグラフィー、電気泳動、電気浸透膜処理等に付すか、

たゲル粒子を用いるゲル濾過に付して、1分子中の硫酸基数がそれぞれ2以上である酸性糖混合物を分取することにより得ることができる。上記をはじめ本明細書にいう分子量は、プルラン(Shodex standard P-82)、ネオアガロピオース、ネオアガロテトラオースおよびネオアガロヘキサオースを標準とし、カラムとしてAsahipak G SM-700(7.6×500mm)+Asahipak GS-220 HQ(7.6×300mm)(旭化成工業(株)製)、溶離液として50mM NaClを用いるGPC法によって決定される分子量である。

【0034】本製法1は前記免疫賦活剤1及び2の有効成分である酸性糖の製法でもある。本発明では、原材料としてアガロースを基本骨格に持つ酸性多糖、またはポルフィランを主成分の1つとして含有する紅藻類に属する海藻を用いる。好適に用い得る海藻としては、オゴノリ属に属する海藻、例えばオゴノリ、ツルシラモ、シラモ、オオオゴノリ、ミゾオゴノリ、カバノリ、アマノリ属に属する海藻、例えばマルバアマノリ、ツクシアマノリ、オニアマノリ、コスジノリ、ウップルイノリ、アサクサノリ、スサビノリ、マルバチシマクロノリ、オオノリ、フイリタサを挙げることができる。この他ウシケ

も本発明に使用できるものがある。これらの紅藻類に属する海藻中、より好ましいものはオゴノリ属またはアマノリ属に属する海藻である。

【0035】これらの海藻は最初から水性溶液による抽出に付しても活性成分を得ることもできるが、まず、異物を除き、また組織に柔軟性を与えて後の処理を容易にするため、水または温水（例えば80℃以下の温水）で短時間洗浄する、あるいは油分、少糖類、油溶性色素を除く意味でこれらを溶解し得る有機溶媒で海藻を処理する等の操作を、各単独でまたは必要に応じて組み合わせて行なうこともでき、その方が好ましい。かかる有機溶媒としては例えばメタノール、エタノール、n-プロパノール、イソプロパノール等の低級アルカノール、アセトン等の低級アルカノン等を用いることができる。また、これらの溶媒と少量の水（80:20V/V程度まで）との混合物であってもよい。メタノール、エタノール及びこれらと水との混合溶媒が好ましい。かかる有機溶媒（水との混合溶媒を含む）の使用量は特に制限はないが、海藻（乾燥物基準）100gに対して0.5～10Lぐらいが適当である。有機溶媒抽出の温度時間は特に制限はないが、室温以上例えば30℃～有機溶媒の沸点で5分以上例えば15分～1時間が適当である。

【0036】次に有機溶媒をデカント、濾過、遠心分離等で除去して得られる残渣を水性溶媒による抽出に付す。水性溶媒としては水、酸性水溶液または塩基性水溶液が用いられるが、少量の例えば10容量%以下の親水性有機溶媒をさらに含有していてもよい。「酸性」及び「塩基性」を与えるのは通常それぞれ酸及び塩基であるが、常用される緩衝剤であってもよい。酸としては特に制限はないが、塩酸、硫酸、リン酸等の無機酸、酢酸、プロピオン酸、クエン酸等の有機酸を用いることができる。塩基としては特に制限はないが、アンモニア、アルカリもしくはアルカリ土類金属の水酸化物、炭酸塩もしくは重炭酸塩、例えば水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、重炭酸ナトリウム、重炭酸カリウム等を通常使用する。塩基としてはさらにピリジン等の親水性有機塩基であってもよい。緩衝剤としてはトリス系、リン酸系、クエン酸系、ホウ酸系等の常用の緩衝剤を用いることができる。

【0037】水性溶媒のpHは特に制限はないが通常1～13、特に2～12が適当である。水性溶媒の使用量は特に制限はないが通常原海藻（乾燥物基準）100gに対して1～10Lぐらいが適当である。水性溶媒による抽出の温度時間は特に制限はないが、4℃～系の沸騰温度、通常室温～系の沸騰温度で通常5分以上、例えば30分～20時間が適当である。なお、水、酸性水溶液、塩基性水溶液による抽出は2つ以上直列に組み合わせて行ってもよい（例えば水抽出残渣を酸性水溶液で抽出する等）。

質多糖含有水溶液を得る。通常この段階で酵素処理に付すが、抽出を酸性水溶液または塩基性水溶液を用いて行った場合には酵素処理に適したpHに調整した後酵素処理に付すか、または好ましくは一旦抽出液を中和し（中和に用いる塩基、酸はそれぞれ塩基性水溶液及び酸性水溶液に用いる塩基、酸でよい）、ついで脱塩処理（有機溶媒沈殿後に水に溶解、透析、限外濾過等）を行った後に酵素処理に付す。また、量的関係を知りたい等の場合には上記で得られる酵素処理に適した液にエタノール、またはエタノールおよび塩（塩化ナトリウム等）を加え、生じた沈殿を回収し、凍結乾燥に付したものを酵素処理に付してもよい。

【0039】本製法1で使用し得る紅藻粘質多糖分解酵素IおよびIIの例としてはβ-アガラゼが挙げられる。なお、β-アガラゼの定義は「アガロース中のD-ガラクトースと3, 6-アンヒドロ-L-ガラクトース残基間のβ1→4ガラクトシド結合を加水分解する酵素」である。本発明で使用し得るβ-アガラゼとしては、例えば、先に例示したシュードモナス・アトランティカ、サイトファーガ・エスピー、ビブリオ・エスピーAP-2起源のβ-アガラゼを挙げることができる。このうちシュードモナス属の微生物を起源とするβ-アガラゼ製剤が市販されている（シグマ社；紅藻粘質多糖分解酵素IおよびIIの混合物）。

【0040】本製法1で使用し得る紅藻粘質多糖分解酵素としては、また、前出の特願平6-57469号の明細書に記載された紅藻粘質多糖分解酵素（紅藻粘質多糖分解酵素IIに該当する）が挙げられる。この酵素は、前記定義の性質に加え、以下の性質を有する：

1) 作用

紅藻粘質多糖をエンド型に加水分解し、重合度4を主体とするオリゴ糖を生成する反応を触媒する；

2) 基質特異性

β1→4ガラクトシド結合を有するガラクトン系の多糖類並びにネオアガロヘキサオース以上の少糖に作用し、カラギーナン、ネオアガロテトラオース、ネオアガロピオース、乳糖には作用しない；

3) 至適pHおよびpH安定性

紅藻粘質多糖であるオゴノリ熱水抽出物を基質としたときの至適pHは4.5～5.5であり、28℃、16時間、基質非存在の条件下では、pH5.5～8.0で安定である；

4) 至適温度および熱安定性

オゴノリ熱水抽出物を基質としたときの至適温度は55℃であり、pH7.5、10分間、基質非存在の条件下では、50℃で安定、95℃で約72.5%の活性が残存している；

5) 失活の条件

完全に失活する；

6) 分子量

41000 (SDS-PAGE法)；

7) 等電点

4.7~5.6 (等電点電気泳動法)；

8) 金属塩等の影響

pH6.0、28℃、1mMの金属塩等の塩濃度下、16時間の処理で、 Ag^+ 、N-プロモスクシンイミドが5%以下、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} が15~50% Fe^{2+} 、 Hg^{2+} が70~80%の残存活性を示し、 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Al^{3+} では安定である。

この紅藻粘質多糖分解酵素の製造例を参考例2に示す。

【0042】紅藻粘質多糖分解酵素IおよびIIの少なくとも1つを含有する酵素源としては各酵素単品、酵素IおよびIIの混合物、酵素Iおよび/またはIIと目的物の取得に悪影響を及ぼさない他の酵素等を含有する粗酵素、酵素Iおよび/またはIIを含有する、生産菌の培養液もしくは培養濾液、または酵素Iおよび/またはIIの生産菌の懸濁液等が挙げられる。前記水性溶媒抽出粘質酸性多糖の本発明でいう紅藻粘質多糖分解酵素IおよびIIの少なくとも1つを含有する酵素源による酵素処理は、多糖1gあたり該酵素(全体として)0.01~10,000u、より好ましくは0.1~1000uを、pH4~9、温度15~95℃で0.5~72時間、より好ましくはpH4~6、温度30~70℃で4~48時間作用させることにより行うことができる。ここで該酵素1uとはpH6.0、温度37℃の条件下で、オゴノリ由来の粘質酸性多糖を基質として作用させたときに、1分間に1μmolのガラクトースに相当する還元糖を生成する酵素量を意味する。なお反応媒体としては前記した、必要に応じpH調整、脱塩処理等を行った後の水性溶媒抽出液、または水、緩衝液等を用いることができる。反応は静置状態で進行させることも、攪拌し、さらにはpHを常に酵素反応が最も効率的に行える値に調整しながら行うこともできる。酵素反応後、通常酵素を加熱等により失活させる。

【0043】上記酵素処理によって粘性多糖はそのβ1→4結合が、通常部分的に、加水分解されて低粘性の酸性糖(酸性多糖+酸性オリゴ糖)になる。該酸性糖の分子量は通常約300~約1,400,000程度である。なお、酵素処理は、上記においては水性溶媒抽出液に対して行っているが、水性溶媒抽出と同時に、すなわち紅藻粘質多糖分解酵素含有水性溶媒を用いて抽出を行うことにより行うこともできる。この場合には酵素反応条件は上記と同様でよいが、抽出条件は酵素反応条件による制約を受ける。

【0044】酵素処理液から分子量100,000より大、好ましくは45,000より大、または3,000から100,000もし

くは200より大、または14から500もしくは200までの任意の値より大、例えば36より大となるような分子量の多糖画分を溶媒沈澱、塩析、限外濾過またはゲル濾過等によって除去する。溶媒沈澱または塩析は比較的高分子量の固形分画分を沈澱画分とし、比較的低分子量の固形分画分を溶存画分とすることにより行なう。

【0045】溶媒沈澱および塩析は常法により行うことができ、溶媒沈澱における溶媒としては親水性有機溶媒、例えばエタノール、メタノール、n-プロパノール、イソプロパノール等の低級アルカノールおよびアセトン等の低級アルカノン、特にエタノールを、塩析における塩としてはリン酸イオンや硫酸イオン等の多価の陰イオンを含む塩、例えば硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウム、リン酸カリウム等、および塩化ナトリウム、塩化カリウム、炭酸バリウム、塩化セチルピリジウム等、特に硫酸アンモニウムを用いることができる。上記のごとき分子量画分の多糖を沈澱させる溶媒や塩の酵素処理液に対する添加量は溶媒の酵素処理液に対する割合または塩の飽和度を徐々に例えば5~15%刻みで上げていくことにより、簡単に見い出すことができる。例えばエタノールによる溶媒沈澱の場合、エタノールを酵素溶液に対し50~90容量%となるように添加すればよい。溶媒沈澱や塩析に際し、温度、pHは特に調整しないでよいが、例えば温度0~20℃程度、pH4~9程度に調整してもよい。溶媒沈澱や塩析による沈澱の除去は遠心分離、濾過等により行うことができる。

【0046】限外濾過に際しては、上記分子量以上の多糖の除去に適した分画分子量の限外濾過膜を用いて限外濾過を行う。限外濾過膜は市販のものを用いることができ、適当なものとして、例えばウルトラフィルターQ0100、P0200(東洋濾紙)、ダイアフローメンブレンYM5、YM10、PM10、YM30、XM50(アミコン)、タイプPLGC、タイプPLCC、タイプPLTK(ミリポア)等を用いることができる。さらに逆浸透膜、イオン交換膜、透析膜等も、場合により、使用可能である。ゲル濾過に際しては、上記分子量以上の多糖の分画に適したゲル粒子を用いてゲル濾過を行う。ゲル粒子は市販のものを用いることができ、適当なものとして、例えば、Superdex 75pg、Sephacryl S-200；セファデクスG-25、G-50、G-75(ファルマシア)；TSKgelトヨパールHW-40、HW-50(東ソー)；セルロファインGCL-90、300(生化学工業)等を用いることができる。溶出剤としては特に制限されないが、例えば0.05MNaCl水溶液等を用いることができる。限外濾過、ゲル濾過における他の条件は通常の限外濾過、ゲル濾過における多糖の分画の場合と同様でよく、特に制限されない。

【0047】上記種々の方法によって特定分子量以上の

物質をイオン性の違いで分離する方法、またはさらに限外濾過、ゲル濾過に付して中性糖および／または分子中の硫酸基数が1の酸性糖等を除いて、分子中の硫酸基数が2以上の酸性糖混合物を得る。物質をイオン性の違いで分離する方法としては、例えば陰イオン交換樹脂による陰イオン交換クロマトグラフィー、電気泳動、または電気浸透膜処理等を用いることができ、上記の比較的低分子量の糖画分含有液をこれに付すことにより、溶存固形分中の中性糖画分と酸性糖画分とを分画し、かつ酸性糖画分を分画する。これらの酸性糖画分分画から1分子中の硫酸基数がそれぞれ2以上である酸性糖混合物よりなる画分を取得する。かかる画分の取得はまた物質の吸着性の差を利用し、親水性基の結合した、シリカゲル系等の担体を用いた順相分配クロマトグラフィーによっても行うことができる。

【0048】陰イオン交換クロマトグラフィー、電気泳動、電気浸透膜処理等、および順相分配クロマトグラフィーは上記沈澱除去液から中性糖画分や1分子中の硫酸基数がそれぞれ1である酸性糖混合物を除去し、1分子中の硫酸基数がそれぞれ2以上である酸性糖を与えることができる限り、常法により行うことができる。例えば陰イオン交換クロマトグラフィーの場合、使用するイオン交換樹脂は強陰イオンタイプのもので弱陰イオンタイプのものでよいが、強陰イオンタイプのものが好ましい。具体的にはダイヤイオンHPA-75（三菱化成製）、Qセファロース、QAEセファデックス（ファルマシア）、TSKgel Super Q-トヨパール、DEAE-トヨパール 650（東ソー）、DEAE-セルロファイン（生化学工業）等を用いることができる。

【0049】前述の高分子糖画分除去液を、通常、イオン交換カラムに乗せ、通常、水→塩水溶液を用いる段階的溶出法または濃度勾配溶出法により溶出する。これにより中性糖混合物、1分子中の硫酸基数が1の酸性糖の混合物、1分子中の硫酸基数が2の酸性糖の混合物、1分子中の硫酸基数が3の酸性糖の混合物…の順に溶出される。塩水溶液の塩としては強酸-強塩基からなる塩、例えば塩化ナトリウム、塩化カリウム等を用いることができる。最終塩濃度は目的分画物のイオン性によって変化するが、一般に0.05~2Mが適当である。溶出液は適当な量ずつ分取する。

【0050】比較的低分子量の糖画分含有液から分子中の硫酸基数がそれぞれ2以上である酸性糖混合物を取得するのに、限外濾過またはゲル濾過を用いることも可能である。可能な理由は、酵素の特異性から硫酸基数が1の酸性糖と2以上の酸性糖との間で明確な分子量の差があることと、中性糖画分は酵素分解されて硫酸基数が2以上の酸性糖との間で明確な分子量の差が生じるからである。この限外濾過、ゲル濾過は分画を意図する分子量

分子量の上限はおおよそ1,000で硫酸基数が2ヶ以上の酸性糖はより大きな分子量を持つため、1,000以上の分子量の多糖を分画するのに適した限外濾過膜、ゲル粒子を用いればよい。具体的な限外濾過膜として例えばダイアフローメンブレンYM5（アミコン）、タイプPLC C（ミリポア）等、ゲル粒子として例えばSuperdex 75pg、セファデックスG-15、セファデックスG-25（ファルマシア）、TSKgelトヨパールHW-40（東ソー）等を用いることができる。取得した目的物含有液の同定は例えば前記GPC法により行うことができる。

【0051】酸性糖の製法2

上記(1)~(5)の本発明の酸性糖中、n-1番目の、すなわち還元末端から2番目の構成単糖がL-ガラクトース-6-硫酸である酸性糖は、紅藻類に属する海藻中に含まれ、水性溶媒で抽出される粘質多糖（粘質酸性多糖）を、前記紅藻粘質多糖分解酵素中IIIと、IおよびIIの少なくとも1つとを含有する酵素源で、加水分解して得られる低粘性酸性糖中の、分子量100,000より大、好ましくは45,000より大、または3,000から100,000もしくは45,000までの任意の値より大、例えば7,500より大の画分、または構成単糖の数が500より大、好ましくは200より大、または14から500もしくは200までの任意の値より大、例えば36より大となるような分子量の画分を溶媒沈澱、塩析、限外濾過またはゲル濾過等によって除去し、得られる比較的低分子量の画分を、物質をイオン性の違いで分離する方法、例えば陰イオン交換クロマトグラフィー、電気泳動、電気浸透膜処理等に付すか、または分画分子量のさらに小さい限外濾過膜を用いる限外濾過またはさらに小さい分子量の多糖類の分画に適したゲル粒子を用いるゲル濾過に付して、1分子中の硫酸基数がそれぞれ2以上である酸性糖混合物を分取することにより得ることができる。

【0052】紅藻粘質多糖分解酵素IIIと、IおよびIIの少なくとも1つとを含有する酵素源としては紅藻粘質多糖分解酵素IIIと、IおよびIIの少なくとも1つとを含有する酵素混合物、これらと目的物の取得に悪影響を及ぼさない他の酵素等を含有する粗酵素、酵素IIIと酵素IおよびIIの少なくとも1つとを含有する、生産菌の培養液もしくは培養濾液、または酵素IIIと酵素IおよびIIの少なくとも1つとを生産する菌の懸濁液等が挙げられる。前出の特願平6-57469号の明細書に記載されたシュードモナス・エスピーO-148(FERM P-13767)の培養濾液には、紅藻粘質多糖分解酵素I、IIおよびIIIのすべてが存在することが本発明者らによって見出された。該培養液からの紅藻粘質多糖分解酵素III（またはIもしくはII）の単離は該酵素の性質を利用して常法により行うことができる。酵素処理される酸性多糖に対する酵素液の割合は酵素処理開始時の酵

使用割合が前者の酵素活性1に対して後者の酵素活性が1~10,000、好ましくは10~50であるようにすればよい、ここで1uは紅藻粘質多糖分解酵素Iおよび/またはIIにおける1uと同義である。

【0053】物質をイオン性の違いにより分離する方法がイオン交換クロマトグラフィーである場合には、中性糖混合物、1分子中の硫酸基数が1の酸性糖の混合物、1分子中の硫酸基数がそれぞれ2である酸性糖混合物、1分子中の硫酸基数がそれぞれ3である酸性糖混合物、……の順に溶出されるので、必要画分を分取すればよい。この場合の塩濃度は、酸性糖混合物が1分子中の硫酸基数がそれぞれ2である酸性糖混合物である場合には0.2~0.5M程度が適当であり、硫酸基数が3以上のものについては2の場合を参考に塩濃度を適宜上げることにより分取し得る。製法2における他の操作は、酵素処理の前操作も含め、製法1におけると同様でよい。

【0054】上記製法1および2のいずれにおいても、工程に入る前、工程のいずれかの段階、または工程終了後に除蛋白、脱塩等の精製操作を行うことができる。除蛋白はトリクロロ酢酸等により蛋白質、ポリペプチド等を沈澱させる等の手段により行うことができる。脱塩は透析、限外濾過（脱塩のための限外濾過）、逆浸透膜処理またはイオン交換処理（脱塩のためのイオン交換処理）により行うのが適当である。

【0055】上記製法1および2のいずれかまたはさらにその後の処理によって得られる酸性糖混合物含有液は、通常、噴霧乾燥、凍結乾燥、熱風乾燥等から適宜選ばれる方法で乾燥して酸性糖混合物を得る。前記製法

(1)及び(2)で得られる酸性糖混合物が前記(1)~(5)に示したような構造を有することは、後述するごとく、紅藻粘質多糖の構造についての既知の知見、酵素の特異性、成分分析値、薄層クロマトグラフィー(TLC)で求めた分子の重合度等から推定される。これらの酸性糖混合物は例えばイオン交換カラムクロマトグラフィーで再精製することによって個々の酸性糖に単離することができる。

【0056】本発明の酸性糖（混合物）は免疫賦活活性を有する。免疫賦活活性としては、例えば、マクロファージ活性化作用の他に、免疫担当細胞が作る腫瘍壊死因子の誘導能を有する。この後者の活性は、これらの酸性糖（混合物）が免疫系の活性化を介しての抗腫瘍活性を有することを示唆するものである。従って以下に述べる本発明の免疫賦活剤は抗腫瘍剤としての使用を包含するものである。前記製法1および2のいずれかまたはその後の精製操作を経て得られる酸性糖混合物、または個々の酸性糖を含有する溶液は、そのまま免疫賦活剤として用いることもできるが、通常、噴霧乾燥、凍結乾燥、熱風乾燥等から適宜選ばれる方法で乾燥し、それ自体とし

【0057】経口投与の場合には、それに適用される錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤などは、通常それらの組成物中に製剤上一般に使用される結合剤、滑沢剤、賦形剤、崩壊剤、湿潤剤のような添加物を含有する。また経口用液体剤として用いる場合は、内用水剤、振盪合剤、懸濁液剤、乳剤、シロップ剤の形態であっても良く、また使用する前に再溶解させる乾燥生成物の形態であってもよい。さらに、このような液体製剤は通常用いられる添加剤、保存剤のいずれを含有していても良い。注射用の場合には、その組成物は通常安定剤、緩衝剤、保存剤、等張化剤などの添加剤を含有し、通常単位投与量アンプルまたは多投与量容器の形態で提供される。なお、上記組成物は水溶液、懸濁液、溶液、油性または水性ビヒクル中の乳液のような形態であっても良く、一方活性成分は使用する前に適当なビヒクルたとえば発熱物質不含の滅菌した水で再溶解させる粉末であっても良い。

【0058】本発明の免疫賦活剤はヒトまたは動物、例えば免疫力が低下している人、特に高齢や疾病等により免疫機能が低下している人に経口または非経口的に投与される。経口投与は舌下投与を包含する。非経口投与は注射たとえば皮下、筋肉、静脈注射、点滴を含む。本発明の免疫賦活剤中の有効成分固形物の量は種々変えることができるが、通常5~100%(w/w)、特に10~60%(w/w)が適当である。本発明の免疫賦活剤の投与量はヒトや動物により、また年齢、個人差、病状などに影響されるので、場合によって下記範囲外の量を投与する場合も生ずるが、一般にヒトを対象とする場合の経口投与量は活性成分固形物量として大人1日体重1kg当たり0.5~1,000mg、好ましくは1~300mgであり、1回または2もしくは3回に分けて投与する。

【0059】なお本免疫賦活剤活性成分（具体的には各実施例で得られる乾燥物）の急性毒性はいずれもLD₅₀（ICR系マウス、経口投与）>3g/kgであった。また、本免疫賦活剤活性成分は多量に摂取しても生体に悪影響を与えない利点を有することから、そのまま、または種々の栄養分等を加えて、もしくは飲食品中に含有せしめて免疫賦活作用の機能をもたせた機能性食品、健康食品として食してもよい。すなわち、例えば各種ビタミン類、ミネラル類等の栄養分を加えて、例えば栄養ドリンク、豆乳、スープ等の液状の食品や各種形状の固形食品、さらには粉末状としてそのままあるいは各種食品へ添加して用いることもできる。かかる機能性食品、健康食品としての本免疫賦活剤中の有効成分の含有量、摂取量はそれぞれ上記製薬における含有量、投与量と同様でよい。

【0060】

【実施例】

参考例1

水を加え40℃で30分処理して温水洗浄を行った。洗液を完全に除去した後、エタノール500mLを加え45℃で15分処理し同様に洗浄を行った。次に蒸留水2Lを加え沸騰水浴中で3時間、適宜攪拌しながら抽出を行い、得られた抽出液を合わせヌッチェで吸引濾過して固形成分を完全に除去した。得られた濾液に4倍量のエタノールを加え、沈澱を回収し、凍結乾燥により乾燥物(粘質酸性多糖)2.6gを得た。

【0061】参考例2

紅藻粘質多糖分解酵素の調製

シュードモナス・エスピーO-148(FERM P-13767)を寒天0.1g/dL、ポリペプトン0.1g/dL、 K_2HPO_4 0.1g/dL、NaCl 0.1g/dL および $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05g/dLよりなるpH7.0の前培養培地において培養せしめた。ついで、この得られた前培養液300mLを、オゴノリ粉末1.5g/dL、ポリペプトン0.1g/dL、酵母エキス0.1g/dL、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25g/dL、NaCl 0.1g/dL、 $CaCl_2$ 0.01g/dL、消泡剤としてのアデカノールLG126(旭電化工業株式会社)0.03g/dLの組成を有するpH6.0の培地15Lを入れた30Lのジャーファーマンター(菌培養基)に植菌し、28℃の温度で、3日間培養した。培養は、通気量0.5VVM(空塔速度)、攪拌速度200rpmで行った。

【0062】培養終了後、菌体を濾過により取り除き、培養濾液12.7Lを得た。この培養濾液の酵素活性は0.5u/mLであった。また、かかる培養濾液を限外濾過濃縮装置：ザルトコンミニ(ドイツ国ザルトリウス社)で約15倍濃縮し、860mLの濃縮液(活性：7.7u/mL)を得、さらにこの濃縮液をアガロースゲル：セファロースCL-6B(スウェーデン国ファルマシア社)の500mLのカラムに吸着させ、750mL/hrの流速で、20mM酢酸ナトリウム緩衝液、pH6.0(4℃)で洗浄した後、さらに1250mL/hrの流速で、20mMのTris-HCl緩衝液にて、pH8.0(35℃)で溶出せしめて、活性区分を取得した。この得られた区分をゲル濾過用樹脂トヨパールHW65S(東ソー株式会社)500mLのカラムに吸着させ、1,000mL/hrの流速にて、4MのNaCl/20mM酢酸ソーダ緩衝液(pH6.0)で洗浄した後、1500mL/hrの流速にて、2MのNaCl/20mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)で溶出して、ほぼ純品に近い精製酵素活性区分(46.7u/mg蛋白質)260mLを得た。この活性収率は、約27.6%であった。

【0063】参考例3

紅藻粘質多糖分解酵素による粘質酸性多糖の加水分解

参考例1で得られた乾燥物(粘質酸性多糖)1.5gを

分解し、低粘性酸性糖含有水溶液を得、これを凍結乾燥して乾燥物(試料A 1.48g)を得た。

【0064】実施例1

低粘性酸性糖の溶媒沈澱および陰イオン交換樹脂クロマトグラフィーによる分画による本発明酸性糖の製造

参考例3で得られた低粘性酸性糖含有水溶液を4分の1に濃縮後、4倍量のエタノールを加え難溶解性の高分子物質を沈澱させ、遠心分離(5000rpm)により除去した。上澄液を凍結乾燥し、乾燥物を得た。この凍結乾燥物を少量の蒸留水に溶解し、強陰イオン交換樹脂ダイヤイオンHPA-75(三菱化成株式会社)を充填したカラム(2.3φ×20cm)に乗せ、水、0.02M塩化ナトリウムおよび0.50M塩化ナトリウムのリニアグラジエント(0~80mL:H₂O, 80~480mL:0.02MNaCl, 480~880mL:0.02~0.50MNaCl)で流速40mL/hrで溶出を行い、溶出液は8mLずつ分取した。各画分について含有糖をフェノール硫酸法で比色定量し(410nm)、画分No.3~10、画分No.30~40および画分No.75~85をそれぞれ凍結乾燥して、乾燥物として試料B(中性糖)0.840g、試料C(酸性糖)0.170gおよび試料D(本発明の酸性糖)0.115gを得た。

【0065】参考例4

シュードモナス・エスピーO-148(FERM P-13767)の培養濾液(酵素液)の調製

シュードモナス・エスピーO-148(FERM P-13767)を寒天0.1g/dL、ポリペプトン0.1g/dL、 K_2HPO_4 0.1g/dL、NaCl 0.1g/dL および $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05g/dLよりなるpH7.0の前培養培地において培養せしめた。ついで、この得られた前培養液300mLを、オゴノリ粉末1.5g/dL、ポリペプトン0.1g/dL、酵母エキス0.1g/dL、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25g/dL、NaCl 0.1g/dL、 $CaCl_2$ 0.01g/dLおよび消泡剤としてのアデカノールLG126(旭電化工業株式会社)0.03g/dLの組成を有するpH6.0の培地15Lを入れた30Lのジャーファーマンターに植菌し、28℃の温度で、3日間培養した。培養は、通気量0.5VVM、攪拌速度200rpmで行った。培養終了後、菌体を濾過により取り除き、培養濾液12.7Lを得た。この培養濾液の酵素活性は、0.5u/mLであった。

【0066】実施例2

低粘性酸性糖の溶媒沈澱および陰イオン交換樹脂クロマトグラフィーによる分画による本発明酸性糖の製造

参考例1で得られた乾燥物(粘質酸性多糖)1.5gを蒸留水150mLに溶解し、参考例4で得られた培養濾液濃縮液を2u/gになるように加え、37℃で48時間作用させて加水分解し、低粘性酸性糖含有水溶液を得た。この水溶液を4分の1に濃縮後、4倍量のエタノールを加え難溶解性の高分子物質を沈澱させ、遠心分離(5,000

イオン交換樹脂ダイヤイオンHPA-75を充填したカラム(2.3φ×20cm)に乗せ、水、0.02M塩化ナトリウムおよび0.50M塩化ナトリウムのリニアグラジエント(0~80mL:H₂O, 80~880mL:0.02M NaCl, 880~1680mL:0.02~0.50M NaCl)で流速40mL/hrで溶出を行い、溶出液は8mLずつ分取した。各画分について含有量をフェノール硫酸法で比色定量し(410nm)、それぞれ別個の成分を含む5つの画分、中性糖画分、酸性糖画分1、酸性糖画分2、酸性糖画分3および酸性糖画分4を溶出順に得、これら5つのうち最後の溶出画分4(画分No.120~130)を凍結乾燥して乾燥物(試料E:本発明の酸性糖)45mgを得た。

【0067】実施例3

低粘性酸性糖の限外濾過による分画による酸性糖の製造
参考例1で得られた乾燥物(粘質酸性多糖)1.5gを蒸留水150mLに溶解し、シュードモナス属由来のβ-アガラゼ(シグマ社)1,000uを加えて30℃で48時間反応させて加水分解し、反応終了後沸騰水浴中に10分間保持して酵素を失活させ、低粘性酸性糖含有水溶液を得た。この水溶液を凍結乾燥して乾燥物を得た。この0.5gを10mlの蒸留水に溶解し、モルカットL(LTK24、公称分画分子量30,000、ミリポア製)2ヶに分注して透過液を得た。さらに得られた透過液をモルカットL(LC24、公称分画分子量5,000、ミリポア製)2ヶで処理*

表1 各試料の各種分析値

試料	3,6-アンヒドロガラクトース (wt%)	硫酸基 (wt%)	重合度
A	35.8	4.2	-
B	45.2	検出されず	2, 4, 6
C	31.4	6.8	4, 6
D	24.6	12.0	6, 8, 10
E	1.3	24.0	4

【0070】紅藻粘質多糖類の化学構造についての既知の知見と表1の結果から、分子の基本骨格と重合度、1分子中に結合している硫酸エステル基数が明かとなり、さらにその硫酸エステル基の結合位置は、用いる酵素の基質特異性より決定される。その結果、試料B、C、D

*し、5倍に濃縮した後さらに5倍量の蒸留水を加えて同様に濃縮した。得られた濃縮液を凍結乾燥して乾燥物(試料F:本発明の酸性糖)32gを得た。試料Fの分子量を測定したところ、4,000~45,000に分布していた。

【0068】実施例4

得られた試料の各種分析値および構造の推定

参考例3および実施例1および2で得られた乾燥物(試料A、B、C、D、E)について各種分析を行った結果を表1に示す。分析項目中3,6-アンヒドロガラクトースはネオアガロピオースをスタンダードとしてW.Yapheらの方法(Yaphe W. et al., Anal. Biochem. 13, 143-148(1965))で測定し、全糖値に対する重量%として算出した。ここで全糖値はフェノール硫酸法[Dubois M. et al., Anal. Chem., 28, 350-356(1956)]によりガラクトタンとして算出し、3,6-アンヒドロガラクトースの含量を補正して求めた。硫酸基含量は1N HCl、105℃で8時間加水分解後、遊離した硫酸イオンをイオンクロマトグラフィーシステムで測定し、硫酸エステル(-SO₃H)に換算し、全糖値に対する重量%として算出した。また重合度はアルカリ処理により硫酸基を脱離した後に薄層クロマトグラフィーによって求めた。

【0069】

【表1】

およびEは以下の構造の糖を主成分とすると推定される。

【0071】

【化14】

23

24



【0072】実施例5

試料A, B, C, DおよびFの免疫賦活活性の測定

免疫賦活活性の指標としてマクロファージ活性化作用を調べた。常法「マクロファージの機能と機能測定法」葉根出版、72頁(1985)によりプロテオースペプトンで誘導したマウスの腹腔細胞を採取し、 4×10^5 /ウェルとなるよう96穴プレートに分注し、1時間培養してマクロファージを付着させた。浮遊細胞を除去した後試料を加え10 g/dL牛胎児血清、ペニシリン、ストレプトマイシンを含むRPMI-1640培地中で72時間培養し、培養上清*

*中の残存グルコースおよび分泌された亜硝酸イオン濃度を測定し、マクロファージ活性化の指標とした。すなわち、グルコース消費量と亜硝酸イオン産生量は、いずれも値の大きい程マクロファージ活性化作用が大きいことを示す。対照として既知のマクロファージ活性化物質であるコンブ由来のラミナリンを用いた。結果を表2に示した。

【0073】

【表2】

表2 各試料のマクロファージ活性化作用

試料	添加量 $\mu\text{g/ml}$	グルコース消費量 mg/ml	亜硝酸イオン 産生量 nmol/ml
コントロール	—	0.6 ± 0.1	6.5 ± 0.4
ラミナリン	50	1.0 ± 0.2	11.3 ± 0.5
試料A (酵素処理物)	50	1.0 ± 0.1	14.5 ± 0.9
試料B	50	0.7 ± 0.1	7.0 ± 0.3
試料C	50	0.8 ± 0.1	8.4 ± 0.2
試料D (本発明試料)	50	1.3 ± 0.2	25.0 ± 2.3
試料F (本発明試料)	50	1.5 ± 0.3	33.4 ± 1.8

【0074】表2から明らかなように、オゴノリ由来の酸性多糖の酵素処理物をエタノール沈澱および陰イオン交換樹脂で処理するか、または酵素処理物をゲル濾過で処理することにより、マクロファージのグルコース消費量および亜硝酸産生能とも著しく増大した。このことはこれらの処理により免疫賦活活性が大巾に増強されることを如実に示すものである。

実施例6

試料A, C, DおよびFの抗腫瘍免疫賦活活性の測定

抗腫瘍免疫賦活活性の指標として、マウスの血中TNF (腫瘍壊死因子) 誘導能を測定した。マウス (C3H/

後にさらにOK-432 (中外製薬「ビシバニール」1KE/匹をTNFの引き金剤として投与し、その2時間後に採血して血清を分離した。血清中のTNF濃度はマウスTNF α 用酵素免疫測定キットFactor-Test m TNF- α (ゼンザイム) を用いて測定した。結果を図1に示す。図1から明らかなごとく、試料D、Fは試料A、Cに比べ飛躍的なTNF誘導能を示した。

【0075】

実施例7 注射剤

試料D 600 g
ポリエキシエチレン硬化ヒマシ油 500 g

に5mLずつ充填する。

実施例 8 カプセル剤

試料F 200g

コーンスターチ 150g

タルク 80g

ステアリン酸マグネシウム 30g

上記成分を十分混和し、60メッシュの金網を通過させて
粒度を調整した後、1,000個のゼラチンカプセルに充填

する。

【0076】

【発明の効果】本発明のまたは本発明の免疫賦活剤の有効成分である、紅藻粘質多糖より得られる酸性糖は優れた免疫賦活活性を有する。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明に係る酸性糖のTNF（腫瘍壊死因子）誘導能を示す。

【図1】

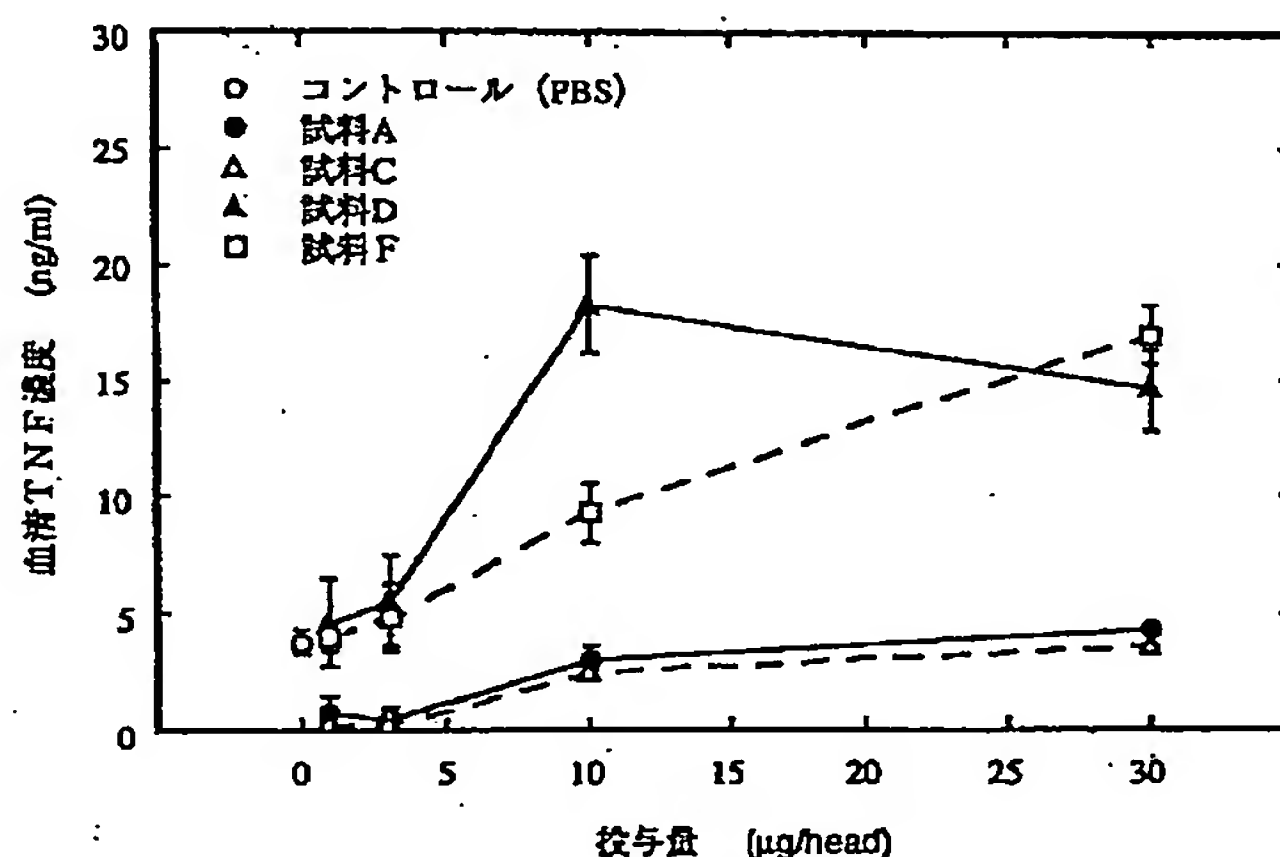


図1. (データは平均±標準誤差で示した)

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

C12P 19/04

/(C12P 19/04

C12R 1:89)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

Z 7432-4B

(72)発明者 山本 緯

愛知県安城市昭和町19-10 新日本化学工
業株式会社内

(72)発明者 伊藤 昌雄

愛知県安城市昭和町19-10 新日本化学工
業株式会社内

(72)発明者 野村 和代

愛知県安城市昭和町19-10 新日本化学工
業株式会社内